

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

**Das elektronenmikroskopische Bild der Glykosaminoglykan-
Makromoleküle in einigen Geweben von Rattenembryonen ,
dargestellt mit der Rutheniumrot-Methode**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Utesch

aus Cammin/Pommern

1972

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

**Das elektronenmikroskopische Bild der Glykosaminoglykan-
Makromoleküle in einigen Geweben von Rattenembryonen ,
dargestellt mit der Rutheniumrot-Methode**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Utesch

aus Cammin/Pommern

Referent: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Merker

Korreferent: Prof. Dr. med. Willy Schwarz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 11. 4. 1972

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	1
Material und Methode	5
Resultate	6
Diskussion	10
Zusammenfassung	15

Literaturverzeichnis

Lebenslauf



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung

Bei der Entwicklung des tierischen Organismus spielt das Mesenchym, aus dem die Binde- und Stützgewebe hervorgehen, eine wichtige Rolle. Ein beträchtlicher Prozentsatz des neugeborenen Organismus besteht aus bindegewebiger Interzellulärsubstanz des Mesenchyms. Aber nicht nur die quantitative Bedeutung weist auf die Wichtigkeit dieses Gewebes hin. Während der Morphogenese prägen die Skelettanlagen die typische Form des späteren Individuums, sind also formbildend. Darüberhinaus muß an dieser Stelle auch auf die induzierende Wirkung des Kollagens auf die Differenzierung und das organoide Wachstum von Epithelverbänden hingewiesen werden. (Felland Grobstein, 1968; Grobstein, 1953; Merker, 1970; Merker und Neubert, 1972; Wessels, 1963). Alle diese Eigenschaften und Funktionen machen die mesenchymale Interzellulärsubstanz zu einem wichtigen Faktor der normalen Ontogenese. Die Kenntnis dieser normalen Mesenchymentwicklung und -reifung ist Voraussetzung zum Verständnis, zur Deutung und zur Systematisierung von Mißbildungen, die auf Defekten am Bindegewebe, besonders aber am Stützgewebe, beruhen. Ohne Zweifel sind zum Beispiel die meisten Mißbildungen an den Extremitäten als Störungen der Mesenchymentwicklung aufzufassen.

Inzwischen konnten durch elektronmikroskopische und biochemische Untersuchungen die feinstrukturellen und molekularen Vorgänge während der Bildung, Sekretion und extrazellulären Reifung der bindegewebigen Interzellulärsubstanz soweit geklärt werden, daß ein annähernd logisches und lückenloses Bild von diesen Vorgängen konstruiert werden kann. Die Entwicklung beginnt sehr früh mit dem Freiwerden einzelner Zellen aus den Epithelverbänden der drei Keimblätter, besonders des Mesoderms. Diese Zellen differenzieren sich und beginnen mit der Synthese der mesenchymalen Interzellulärsubstanz. Sie besteht vorwiegend aus Kollagen und Mucopolysaccharid-Protein-Komplexen (Glykosaminoglykane = GAG). Daneben kommen natürlich alle Substanzen vor, die von den Gefäßen zu den Zellen und umgekehrt transportiert werden (Boedtker and Doty, 1955; Branwood, 1963; Fernandez-Madrid, 1970; Fernando and Movat, 1963; Grassmann et al. 1965; Hodge, 1958;

Hörmann und Wilm, 1964; Kühn, 1962; Kühn und Zimmer, 1961; Kühn et al., 1960; Merker, 1961 a, b; Merker und Struwe, 1971; Meyer, 1954, 1969; Nemetschek, 1965; Rohr, 1965; Ross, 1968; Schmitt, 1959; Schwarz, 1955, 1957, 1960, 1964; Schwarz und Merker, 1959; Schwarz et al., 1958; Wassermann, 1956).

Die neugebildeten Kollagenstrukturen und die Glykosaminoglykane werden nach der Synthese in den Extrazellulärraum abgegeben. Biochemische Untersuchungen zeigen, daß die Synthese des Kollagens und des Proteinanteils der GAG am rauen endoplasmatischen Reticulum (ER) stattfindet. Das Vorhandensein eines rauen ER mit Polysomen (die Zahl der Ribosomen pro Polysom schwankt zwischen 8 und 20 (Merker und Struwe, 1971)) ist deshalb ein elektronenmikroskopisches Charakteristikum von aktiv sezernierenden Mesenchymzellen oder Fibroblasten. Die Form und auch der weitere Weg dieser Syntheseprodukte ist für das Kollagen noch nicht ganz klar. Die Kollagenmoleküle gelangen nicht direkt in den Extrazellulärraum, sondern erreichen zuerst das Hohlraumsystem des ER. Der Mechanismus der Penetration dieser relativ großen Moleküle durch die Membranen des ER ist noch nicht genau bekannt. Ein direkter Einbau der Ribosomen in die Membranen des ER und somit eine direkte Abgabe der entstehenden Polypeptidketten in die Hohlräume wäre denkbar. Diese Möglichkeit ist aber nicht sehr wahrscheinlich, denn die Ribosomen können sich leicht (experimentell und unter pathologischen Bedingungen) von der Membran lösen. Eine Verankerung der Ribosomen über Membranporen, durch die dann die gebildeten Polypeptide in das Hohlraumsystem hineingeschoben würden, wäre eine weitere Möglichkeit. Die Bilder von ER-Membranen zeigen aber im Elektronenmikroskop eine typische Doppelmembran, die auch im Bereich der aufsitzenden Ribosomen keine deutliche Veränderung des Aufbaus zeigt. Dagegen konnte Prockop (1969) eine Stapelung von Kollagenvorstufen im Grundcytoplasma von Fibroblasten nachweisen, so daß man mit einer erst sekundären Penetration durch die Membranen des ER rechnen kann.

Im Hohlraumsystem des ER aggregieren vermutlich die kollagenen Polypeptidketten zu Tropokollagen-Molekülen oder möglicherweise auch schon zu größeren Einheiten. Ihre Kürze und ihr unregelmäßiger Verlauf im elektronenmikroskopischen Bild weisen darauf hin, daß sie noch

nicht gestreckt verlaufen (Merker und Struwe, 1971). Die Sekretion des Inhalts des ER in den Extrazellulärraum kann entweder direkt oder in Analogie zu anderen proteinsezernierenden Zellen via Golgi-Apparat erfolgen. Die großen Golgi-Vakuolen enthalten jedoch kein Material, das dem Inhalt der Hohlräume des ER ähnelt. Deshalb ist eine direkte Öffnung des ER nach außen anzunehmen, da die Zahl der Golgi-Vakuolen, die diese Funktionen auch ausüben können, sehr klein ist. Untersuchungen mit radioaktiv markierten Substanzen (^3H -Prolin) belegen diese Resultate. (Rohr, 1965; Rohr and Jurukova, 1968; Ross, 1968; Ross and Benditt, 1965).

Der Proteinanteil der GAG wird ebenfalls an den Ribosomen gebildet und dann zum Golgi-Apparat transportiert. Dort geht die Koppelung mit dem Mucopolysaccharidanteil, der vorher durch Enzyme des Hyaloplasmas und der Mikrosomen synthetisiert wurde, und auch die Sulfatierung vor sich. Zellen, die GAG in großer Menge synthetisieren und sezernieren, sind deshalb durch einen großen Golgi-Apparat mit vielen Vakuolen gekennzeichnet (Badinez et al., 1962; Dietrich et al., 1970; Dziewiatkowski, 1962; Fewer et al., 1964; Goldman and Lane, 1964; Horwitz and Dorfman, 1968; Lindner, 1963; Merker et al., 1960; Louisot et Got, 1970; Priestly et al., 1969). Unter dem Elektronenmikroskop kann man typische GAG-Makromoleküle in diesen Vakuolen darstellen. Die Sekretion von GAG erfolgt nun durch Öffnung dieser Vakuolen nach außen. Die Sekretion von Kollagen und GAG erfolgt also auf getrennten Wegen (Merker und Struwe, 1971).

Im extrazellulären Raum laufen jetzt zahlreiche Vorgänge ab, --- Filamentbildung, Fibrillenbildung und Dickenwachstum, Faserbildung und Texturprägung --- die schließlich zum typischen ausgereiften Bindegewebe führen. Dabei spielen räumliche Beziehungen zwischen Kollagen und GAG eine wichtige Rolle (Merker, 1961 a, b; Schwarz, 1964).

Die Bildung der mesenchymalen Interzellulärsubstanz während der embryonalen Entwicklung beginnt mit der Sekretion von GAG. Anfänglich können wir nur diese Makromoleküle im Extrazellulärraum finden (Klöppel, 1969).

Die eigentliche Darstellung der GAG im EM ist bisher nicht oder nur sehr schwierig gelungen (Eisenstein et al., 1970; Geyer et al., 1970; Revel, 1964; Serafini-Fracassini and Smith, 1966; Smith and Serafini-Fracassini, 1968; Smith and Frame, 1969; Serafini-Fracassini et al., 1970 a, b; Serafini-Fracassini and Stimson, 1970). Erst seit der Erarbeitung der sogenannten Rutheniumrot-Methode (Luft, 1965) ist eine morphologische Erfassungsmöglichkeit routinemäßig gegeben. Andere bisher vorgeschlagene elektronenmikroskopische Nachweismethoden für GAG waren nur schwer reproduzierbar oder zu aufwendig. Obwohl auch die Rutheniumrot-Methode nicht sehr spezifisch ist, hat sie doch ihren Nutzen bei vielen Untersuchungen bereits unter Beweis gestellt (Anderson and Sajdera, 1971; Luft, 1965; Goldstein, 1969; Kajikawa et al., 1970; Matukas et al., 1967; Myers et al., 1969; Pihl, 1970; Pihl et al., 1968; Roy, 1970). Die Anfärbung, das heißt die Erhöhung der Dichte, beruht auf der Besetzung der zahlreichen negativen Gruppen der als Polyanionen reagierenden GAG mit einer elektronendichten Substanz, hier Rutheniumrot. Zweifellos trifft dieses Verhalten auch auf viele andere organische Bestandteile zu, jedoch ist im hier interessierenden Interzellularraum des frühen Mesenchyms keine Struktur vorhanden, die sich entsprechend verhält und deshalb mit GAG verwechselt werden kann.

Die Möglichkeit einer Darstellung der GAG erlaubt es, zu vielen Fragen der Struktur und Funktion dieser Makromoleküle Stellung zu nehmen. Wir untersuchten deshalb das Mesenchym von Rattenembryonen mit der Rutheniumrot-Methode elektronenmikroskopisch, um Struktur und Verteilung der GAG in diesem Gewebe zu erfassen und zu folgenden Fragen Stellung zu nehmen:

1. Wann treten die ersten GAG-Makromoleküle auf?
2. Bestehen im morphologischen Verhalten der GAG regionale Unterschiede?
3. Welche räumlichen Beziehungen zwischen GAG und Kollagenstruktur sind darzustellen?

Material und Methode

Das verwendete Untersuchungsmaterial stammt aus verschiedenen Geweben von Rattenembryonen (Wistarstamm FW 68). Die Schwangerschaftsdauer konnte nach folgender Methode relativ genau bestimmt werden: die Tiere werden in künstlich beleuchteten Räumen mit Temperatur- und Feuchtigkeitsregelung gehalten. Normalerweise findet die Begattung in einem großen Prozentsatz zwischen 0⁰⁰ und 2.00 Uhr statt. Durch Umkehr des Tag-Nacht-Rhythmus konnte ein Häufigkeitsmaximum des Bespringens zwischen 7.30 und 9.30 Uhr erreicht werden. Weibliche Tiere im Östrus wurden in dieser Zeit mit Böcken verpaart und waren dann bereits um 8.00 Uhr zu 80 % spermienpositiv, so daß wir diesen Zeitpunkt als Schwangerschaftsbeginn festsetzten. Die folgenden 24 Stunden werden als Tag 0 bezeichnet.

Bei unserer Untersuchung wurden Rattenembryonen von Tag 8 bis 20 verwendet.

Nach Schnittentbindung erfolgte sofort die Fixierung der Embryonen in toto und danach entweder die Einbettung in toto oder erst nach der Isolierung des gewünschten Gewebes bzw. Organs.

Das Material wurde nach folgendem Verfahren fixiert: wir brachten die Foeten in 1,4 %igen Glutaraldehyd (0,1 M Cacodylatpuffer) mit einem Zusatz von 1500 ppm Rutheniumrot für 1-2 Stunden ein, anschließend erfolgte mehrmaliges Waschen in 0,1 M Cacodylatpuffer mit einem Zusatz von 800 ppm Rutheniumrot und schließlich Nachfixation in 2 %iger Os O₄-Lösung (0,5 M Cacodylatpuffer) mit einem Zusatz von 400 ppm Rutheniumrot.

Nach Entwässerung in der Acetonreihe erfolgte die Einbettung in Micropal (Fa. Ferak, Berlin). Die Schnitte wurden mit dem Reichert- und LKB-Ultratronen hergestellt. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Siemens Elmiskop I und I a.

Zur genauen Lokalisierung des Schnittes und besseren Orientierung wurden etwa 1/_u dicke Schnitte hergestellt, die nach Färbung mit alkalischer (Boraxzusatz) Giemsalösung für 1 Min. bei 60° C lichtmikroskopisch gut zu beurteilen sind.

Resultate:

Der Versuch einer Darstellung der elektronenmikroskopisch faßbaren Strukturen im mesenchymalen Interzellulärraum soll von dem Zeitpunkt an begonnen werden, an dem sich mesodermale Zellen zwischen Ektoderm und Entoderm einschieben. Dieser Zeitpunkt entspricht dem späten Tag 8. In dieser Phase haben sich die mesodermalen Epithelverbände noch nicht gebildet, und es liegt, durch weite Interzellulärräume getrennt, ein mesenchymähnlicher Zellverband vor. Zwischen diesen Zellen lassen sich mit den üblichen Präpariermethoden noch keine Strukturen darstellen. Nach Anwendung der Rutheniumrot-Methode aber findet man vereinzelt GAG-Makromoleküle, die aufgrund ihres morphologischen Verhaltens in zwei Typen eingeteilt werden können. Bei Durchmusterung größerer Flächen fällt die unregelmäßige Verteilung dieser Strukturen auf, jedoch kann mit gewisser Einschränkung das Vorkommen von einem GAG-Molekül auf einer Schnittfläche von 2-3 μ geschätzt werden. Der 1. Typ der GAG-Makromoleküle besteht aus einem dichten Zentrum mit einem Durchmesser von 200-500 Å, von dem aus schlingenförmig oder gestreckt feine Fäden von etwa 20-40 Å Dicke ausgehen. Der Hof mit derartigen Filamenten um das dichte Zentrum herum hat eine Radiuslänge bis zu einem Mikron. An einigen Stellen kann gezeigt werden, daß die feinen Fäden benachbarter Strukturen sich berühren.

Diese Bilder vom morphologischen Verhalten der GAG-Makromoleküle im sogenannten praemesodermalen Mesenchym gelten auch für die nächste Zeit bis zur Ausprägung der epithelialen Strukturen des Mesoderms: Somit, Coelomhöhle und Chorda. Es treten dann aber zunehmend einzelne, ebenfalls elektronendichte GAG auf, die zwar auch ein Zentrum mit einem Durchmesser von 200-400 Å aufweisen, jedoch nur einzelne feine Fäden aussenden. Bei diesen Strukturen handelt es sich um den 2. Typ der GAG-Makromoleküle. Ein Hof mit einem Fadengeflecht um dieses dunkle Zentrum fehlt besonders bei den Elementen, von denen in der Schnittebene nur ein oder zwei Fäden, dann meistens polar gestellt, abgehen.

Nach Ausbildung der Chorda beginnt in diesem axialen Bereich das erste Auftreten kollagener Filamente als Anlage der Chordascheide.

Es handelt sich entweder um ein dichtgepacktes granulär-fädiges Material, in dem auch bei hoher Auflösung, nicht zuletzt wegen der geringen Dichte, keine Einzelheiten getrennt werden können, oder aber um feine Filamente, die bereits weitgehend gestreckt verlaufen. Die Dicke dieser Filamente schwankt zwischen 80 und 150 Å. Eine Querstreifung ist noch nicht darzustellen. Zu diesen Filamenten, die in Analogie zu anderen Untersuchungen als Kollagenstrukturen zu bezeichnen sind, ziehen einige der beschriebenen feinen Fäden der GAG-Makromoleküle vom 1. oder 2. Typ heran und berühren sie. Deutlich wird diese räumliche Beziehung besonders dann, wenn die ersten Kollagenfibrillen entstehen. Sie haben ungefähr einen Durchmesser von 150-250 Å und zeigen mehr oder weniger deutlich bereits eine Querstreifung. In ihrer Umgebung oder ihnen direkt angelagert ist häufig ein nur schlecht definierbares Material angehäuft, in dem nur bei sehr geringer Schnittdicke und bei hoher Auflösung sehr dünne Filamente in wirrer Verflechtung nachgewiesen werden können. Offenbar handelt es sich hier um die beschriebenen GAG-Makromoleküle, die aber durch ihre gegenseitige Verflechtung nicht so geknäuelte sind und deshalb auch keine dichten Zentren bilden.

Das bisher beschriebene Bild der GAG-Makromoleküle bleibt zunächst in den verschiedenen Abschnitten des sich entwickelnden embryonalen Organismus erhalten. Allerdings nimmt die Zahl der kollagenen Strukturen laufend zu. Eine neue morphologische Situation entsteht dann, wenn die entstehenden Kollagenfibrillen sich zu größeren Bündeln, den Fasern, zusammenfinden. Während in den kollagenfreien Bezirken die beiden Typen von GAG wie bisher locker verteilt vorkommen, kann man auf Grund der GAG-Kollagen-Beziehungen zwei Fibrillentypen unterscheiden:

1. An isoliert verlaufenden Fibrillen oder an Fibrillen aus locker gepackten Bündeln finden sich gehäuft elektronendichte GAG vom Typ 2. Die zentralen dichten Granula liegen dabei in einer Entfernung von 50-200 Å, häufig sogar in annähernd regelmäßigen Abständen, neben den Fibrillen. Bei hoher Vergrößerung läßt sich zeigen, daß die GAG-Granula über feine Fäden mit den Kollagenfibrillen verknüpft sind. Diese teilweise regelmäßige Anordnung der GAG entlang der Fibrillenoberfläche erfolgt untereinander in einem ständig beibehal-

tenen Abstand von 600-700 Å.

2. In größeren Bündeln von Kollagenfibrillen, besonders in den zentralen Abschnitten, sind die eben beschriebenen GAG-Strukturen verringert. Hier läßt sich aber zwischen den Fibrillen ein fädiges Material nachweisen, das jedoch häufig weniger elektronendicht ist, als die bisher beschriebenen GAG. Es findet sich in solchen Bündeln ebenfalls in regelmäßigen Abständen von 600-700 Å, also in Abhängigkeit von der genuinen Querstreifung, so daß die Fibrillenoberfläche etwas gezackt aussieht.

Diese Beschreibung der beiden Fibrillentypen auf der Grundlage der GAG-Morphologie trifft für fast alle sich jetzt entwickelnden Bindegewebsformationen zu. Eine Ausnahme bildet jedoch die Interzellularsubstanz des Knorpels, der als Modell des späteren Skelettsystems relativ frühzeitig angelegt wird. Diese später mineralisierende Interzellularsubstanz (verkalkter Vorknorpel) unterscheidet sich elektronenmikroskopisch deutlich von allen bisher beschriebenen Bindegewebe. Man findet hier kollagene Fibrillen, die ungefähr 150-200 Å dick sind und keinerlei Anzeichen einer Bündelung zeigen. Jede Fibrille verläuft also isoliert, eine Vorzugsrichtung des Verlaufs ist nicht darzustellen. In den Fibrillen selbst sind nur bei hohen Vergrößerungen und günstiger Schnitttrichtung Zeichen einer Querstreifung zu erkennen. Mit der Rutheniumrot-Methode sind hier ebenfalls GAG nachzuweisen, die entweder unabhängig von den Kollagenfibrillen vorkommen oder aber eine außerordentlich enge Beziehung zu ihnen haben. Die frei vorkommenden GAG bestehen weitgehend aus den bereits beschriebenen zentralen dichten Granula von 300-500 Å Durchmesser. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Formen lassen sich jedoch hier nur selten feine Fäden nachweisen. Typisch für diese Form der GAG ist eine eckige, häufig dreieckige Form mit spitzwinkligen Ausziehungen. Die GAG an den kollagenen Fibrillen zeigen im Unterschied zu den GAG anderer Bezirke einen direkten und breitbasigen räumlichen Kontakt zu den Kollagenfibrillen. Obwohl im Verlauf einer Fibrille zahlreiche dieser GAG vorkommen ---- durchschnittlich 10 pro μ ---- ist eine deutliche Ordnung oder Periodizität nicht ausgeprägt.

Innerhalb der Basalmembran sind mit der Rutheniumrot-Methode keine besonderen Strukturen nachzuweisen. GAG des ersten, meistens des zweiten Typs liegen zwar in der Nähe und senden auch einige feine Fäden in Richtung Basalmembran aus, jedoch ist ein gehäuftes oder geordnetes Vorkommen entlang der Basalmembran nicht zu beobachten.

Diskussion

Mit der Rutheniumrot-Methode gelingt es, die GAG-Makromoleküle darzustellen. Einschränkend und kritisch muß aber gesagt werden, daß die Methode keineswegs spezifisch ist (Luft, 1965; Pihl, 1970; Pihl et al., 1968; Roy, 1970; Merker und Struwe, 1971). Sie beruht auf der Bindung der Substanz (Rutheniumrot) an die negativ geladenen Gruppen des als Polyanion reagierenden GAG-Moleküls. Andererseits sind aber bei allen bisherigen Untersuchungen im mesenchymalen Interzellulärraum keine Strukturen bekannt geworden, die ein ähnliches Verhalten zeigen und zu Verwechslungen Anlaß geben könnten. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß die dargestellten Strukturen tatsächlich die gesuchten GAG-Makromoleküle sind. Die typische Morphologie der GAG, wie sie sich uns nach der angewandten Präparationstechnik darstellt, muß nicht unbedingt mit den Verhältnissen in vivo übereinstimmen. Wir sind im Gegenteil der Ansicht, daß die zentrale Verknäuelung ein Artefakt darstellt. Es muß davon ausgegangen werden, daß ein GAG-Makromolekül, normalerweise entfaltet, einen gewissen Raum im Interstitium ausfüllt und kontrolliert. Dieser Entfaltungsgrad kann aber verändert werden. Unter dem Einfluß der Fixierung, durch die heftige Entwässerung und nicht zuletzt durch die Beladung der negativen Gruppen an der Oberfläche mit Rutheniumrot werden die abstoßenden Kräfte abgeschwächt, die die Entfaltung stabilisieren. Die Folge ist ein Zusammenschnurren und eine Knäuelung. Mit diesem Vorgang könnte die Entstehung des dichten Zentrums, von dem aus feine Fäden ausstrahlen, erklärt werden. Ein entsprechendes Verhalten zeigen interessanterweise die DNA-Makromoleküle der Mitochondrien. In den sogenannten Naß-Filamenten kann man elektronenmikroskopisch ähnliche Knäuelungsvorgänge erfassen, die in einer GAG-ähnlichen Struktur resultieren (Lit. siehe Merker, 1969).

Zweifellos sind zwischen den einzelnen GAG-Molekülen Unterschiede im Knäuelungsgrad vorhanden. Die zuerst auftretenden Strukturen sind weniger geknäuelte, und vom Zentrum ziehen viele Fäden weit in die Umgebung hinein. Das andere Extrem stellen die GAG-Strukturen in der Interzellulärsubstanz des Vorknorpels dar. Hier finden sich dunkle Granula, die wenig oder keine Fäden aufweisen.

Dazwischen lassen sich zum Beispiel die GAG im Corium einordnen, die ein großes Zentrum, aber nur wenige Fäden aufweisen. Beim Vergleich der Lokalisation der verschiedenen GAG-Formen mit dem Verteilungsmuster der biochemisch faßbaren GAG kann mit aller Vorsicht eine gewisse Korrelation versucht werden: Der erste GAG-Typ müßte, da er zuerst auftritt, als Hyaluronsäure gedeutet werden. Die übrigen Strukturen müßten dann als Chondroitinsulfat diskutiert werden. Zur Absicherung dieser Vorstellung müßten natürlich noch histochemische und enzymatische Untersuchungen auf elektronenmikroskopischer Ebene durchgeführt werden. Morphologisch nur schlecht vergleichbar und in ihrer Bedeutung noch unbekannt sind die GAG-Strukturen, die den Fibrillen innerhalb der Bündel aufsitzen (siehe auch Meyer, 1954, 1969).

Bei einer zeitabhängigen Untersuchung der Entwicklung der mesenchymalen Interzellulärräume fällt auf, daß bereits vor der Bildung der klassischen mesodermalen Epithelverbände --- Coelomwand, Somit und Chorda --- Räume zwischen Ektoderm und Entoderm vorhanden sind, die mesenchymähnliche Zellverbände enthalten. Zwischen diesen Zellen lassen sich bereits die ersten GAG nachweisen. Die Annahme ist deshalb berechtigt, daß schon sehr früh Zellen in der Lage sind, Interzellulärsubstanz zu bilden. Merker (1972) hat deshalb von einem praemesodermalen Mesenchym gesprochen. Bei der Besprechung der Bildung und Reifung der mesenchymalen Interzellulärsubstanz muß deshalb davon ausgegangen werden, daß am Beginn die Synthese und Sekretion der GAG steht und daß jede weitere Entwicklung, wie z.B. die Verteilung der Mesenchymzellen und die Entstehung der Kollagentextur sich innerhalb eines lockeren Netzwerkes aus diesen Makromolekülen abspielen muß.

Die Hauptfunktion der GAG in diesen frühen Stadien läßt sich aber deutlich aus den elektronenmikroskopischen Bildern ablesen. Die fädigen Makromoleküle sind locker in dem mesenchymalen Interzellulärraum verteilt, der sonst keine größeren Strukturen enthält. Dadurch bilden sie das einzige Strukturelement, das gewisse mechanische Eigenschaften hat. Durch ihre Fähigkeit zur Wasserbindung (Günther und Carsten, 1961; Carsten et al., 1961) können sie darüberhinaus noch einen Turgor erzeugen, der ebenfalls mechanisch belastbar ist.

Sie bilden also ein primitives Stützgerüst, das für die Formgebung während der embryonalen Entwicklung von großer Bedeutung ist, wie z.B. bei der Bildung des definitiven Gaumens (Blunk, 1970; Neuner, 1970; Leimeister, 1970). Durch Quellung und Entquellung, Knäuelung und Entknäuelung oder Änderung des Polymerisationsgrades sind sie darüberhinaus in der Lage, diese Eigenschaften jeweils zu verändern.

Die Kenntnis von der Morphologie und der Anordnung der GAG-Makromoleküle ist für die Erklärung und Deutung von drei Vorgängen wichtig: 1. die geordnete Aggregation der Kollagenvorstufen zu Fibrillen, 2. die Regulierung der Fibrillendicken, möglicherweise auch der Faserdicken und 3. die Prägung der Verlaufsrichtung der kollagenen Bündel, d.h. die Ausbildung der Textur.

Zweifellos bestehen enge räumliche Beziehungen zwischen GAG und Kollagen in der fertigen Fibrille (Banga, 1969; Bosman and Jackson, 1968; Brandt and Muir, 1971; Katzman and Jeanloz, 1971; Lowther et al., 1970; Mathews, 1970; Meyer et al., 1971; Öbrink, 1970, 1971; Toole, 1969; Wasteson and Öbrink, 1968; Wood, 1960). Nach der Vorstellung von den regelmäßig angeordneten Mucopolysaccharidfäden auf einem zentralen Proteinfaden wird angenommen, daß auf die GAG-Matritze das Kollagen geordnet aufwächst (Serafini-Fracassini et al., 1970 a, b, c). Nach der heutigen Vorstellung muß davon ausgegangen werden, daß das GAG-Makromolekül ein Fadenmolekül darstellt und eine beträchtliche Länge erreichen kann. Der eigentliche Zentralfaden soll durch den Proteinanteil (protein core) gebildet werden, von dem aus in regelmäßigen Abständen die Mucopolysaccharidfäden ausstrahlen. Ein GAG-Monomer soll dabei zwei Mucopolysaccharidfäden aussenden. Durch die End-zu-End-Zusammenlagerung der Proteinfäden kommt ein Abstand zwischen den Mucopolysaccharidseitenketten von 700 Å zustande. An diese Seitenketten werden jetzt die Tropokollagenmoleküle oder kleinere Einheiten (zwei Polypeptidketten oder sogar nur eine) gebunden. Dadurch ordnen sich diese Kollagenbausteine, die etwa 2800 Å lang sind, um jeweils 1/4 verschoben an. Da jedes Tropokollagenmolekül immer wiederkehrende und sterisch festgelegte Seitenketten, Faltungen und reagierende Gruppen auf-

weist, kommt durch dieses sogenannte 1/4-Muster die typische Kollagen-querstreifung zustande. Ungeklärt ist dabei aber noch die Frage nach den Ursachen des Fehlens einer Querstreifung in den dünnen Kollagen-filamenten. Entweder spielt hier das Problem der Quantität eine Rolle, d.h. die Menge der Seitenketten, Faltungen und reagierenden Gruppen ist noch zu gering, um in einem elektronenmikroskopisch faßbaren Kontrastunterschied sichtbar zu werden, oder aber die Ordnung der Bausteine geht erst später vor sich (Merker, 1970). Diese letzte Möglichkeit würde aber gegen die vorher geäußerte Vorstellung von der Matritzenwirkung der GAG sprechen. Die geordnete räumliche Beziehung der GAG zu den reifen Fibrillen auch schon während der Entstehung der Filamente läßt uns als Arbeitshypothese die erste Möglichkeit bevorzugen.

Als zweite Funktion der mit dem Kollagen verknüpften GAG während der Fibrillogenese wird die Regulierung der Fibrillendicke diskutiert. Vom elektronenmikroskopischen Bild her kann diese Vorstellung akzeptiert werden. Die stellweise Umhüllung der Fibrillen durch GAG-Fäden oder zumindest ihr Vorkommen an der Fibrilloberfläche können limitierende Faktoren des Dickenwachstums sein. Zweifellos bestehen Beziehungen zwischen der Zusammensetzung der GAG in einem Gewebe und der Fibrillendicke. Ein typisches Beispiel ist die Cornea mit extrem dünnen Fibrillen, die sich in ihrer GAG-Zusammensetzung deutlich von der Sklera mit ihren dicken Fibrillen unterscheidet (Schwarz et al., 1958).

Die Vorstellungen über den Mechanismus der Beeinflussung der Faserdicke durch die GAG sind noch längst nicht so fest umrissen wie die bisher beschriebenen Beziehungen zwischen Kollagen und GAG-Molekülen. Zweifellos zeigt der Fibrillen-GAG-Komplex innerhalb von Fasern ein anderes elektronenmikroskopisches Bild als außerhalb davon. Diese Faser-GAG müssen auch für das besondere Verhalten der Fasern bei interstitiellen Ödemen verantwortlich gemacht werden. Unter diesen Bedingungen ändert sich der Abstand der Fibrillen in der Faser nicht, obwohl sich alle sonstigen Räume deutlich erweitern (Merker, 1972). Eine Kittfunktion der GAG ist deshalb zu vermuten. Ob sie aber die Packungsdichte der Fibrillen in der Faser und die Dicke der Fasern selbst regulieren und beeinflussen ist nicht sicher bekannt.

Näher liegt die Annahme, daß die GAG in der Peripherie der Faser, ähnlich wie bei der Einzelfibrille, hier eine größere Rolle spielen. Die Beurteilung und Deutung dieser Vorgänge wird erschwert durch das Fehlen exakter Meßergebnisse über Fibrillendichte und Faserdicke unter den verschiedensten Bedingungen.

Genauere Vorstellungen bestehen dagegen über die Beteiligung der GAG an der Ausbildung der Zellanordnung und der Fasertextur (Hackelberg, 1971; Weiss, 1959). Nach unseren Befunden muß man davon ausgehen, daß die riesigen Interzellularräume der frühen Embryonen ein lockeres Netz von weit ausgebreiteten GAG-Makromolekülen als Gerüst enthalten. In diesem Gerüst entstehen jetzt durch ungleichmäßige Wachstumsvorgänge, durch örtliche Proliferation, durch Knickungs- und Faltungsvorgänge Druck- und Zugspannungen, die sich in einem trajektoriellen Spannungsliniensystem durch die besondere Anordnung der GAG manifestieren. In diesem Spannungsfeld geht jetzt die Zellvermehrung des Mesenchyms und die Fibrillogenese vor sich. Zellfortsätze, die über längere Strecken ausgesandt werden und Fibrillen, die auf dem GAG-Muster aufwachsen, werden durch das vorhandene GAG-Gerüst räumlich geprägt.

Deutlich sind diese Vorgänge im embryonalen Stroma der Cornea zu erfassen. Dieses Bindegewebsareal macht eine eigentümliche Entwicklung durch. Nach Abschnüren des Linsenbläschens entsteht zunächst ein zellfreier Raum zwischen Linse und Epithel, in dem aber bereits GAG-Makromoleküle elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden können (Hackelberg, 1971). In diesen Raum wandern jetzt von der Peripherie her Mesenchymzellen ein und besiedeln dieses sogenannte primäre Corneastroma. Bereits zu diesem Zeitpunkt findet man eine Ausrichtung dieser Zellen parallel zur Oberfläche. Die dann einsetzende Fibrillogenese paßt sich ebenfalls dem vorgegebenen GAG- und Zellmuster an, und es entwickelt sich auf dieser Grundlage das hochgeordnete Texturgefüge des bleibenden Corneastromas. Da auch nach diesen Untersuchungen die GAG die ersten Strukturen des Interzellularraumes darstellen, kann angenommen werden, daß sie tatsächlich prägend an allen folgenden Vorgängen im mesenchymalen Interzellularraum beteiligt sind.

Zusammenfassung

Mesenchymales Gewebe von Rattenembryonen der Tage 8 bis 20 wurde unter Anwendung der Rutheniumrot-Methode elektronenmikroskopisch untersucht. Etwa ab dem späten Tag 8 wurden vereinzelt GAG-Makromoleküle als erste interzelluläre Strukturen im Mesenchym gefunden. Sie bestehen aus einem dichten Zentrum, von dem aus schlingenförmig oder gestreckt feine Fäden ausgehen. Die feinen Fäden benachbarter Strukturen berühren sich. Später tritt dann noch zunehmend ein zweiter Typ von GAG auf, bei dem vom dichten Zentrum aus nur wenige Fäden, manchmal nur ein oder zwei, abgehen.

Die feinen Fäden der GAG-Makromoleküle vom ersten und zweiten Typ ziehen zu den ersten sich ausbildenden kollagenen Filamenten und berühren sie. Deutlicher wird diese räumliche Beziehung mit dem Auftreten von typischen quergestreiften Kollagenfibrillen. Es lassen sich auf Grund der GAG-Kollagen-Beziehung zwei Fibrillentypen unterscheiden:

1. GAG vom Typ 2 sind bei isoliert verlaufenden Fibrillen oder bei Fibrillen aus locker gepackten Bündeln teilweise sogar regelmäßig entlang der Fibrillenoberfläche angeordnet.
2. GAG der beschriebenen Form fehlen in größeren Bündeln von Kollagenfibrillen. Zwischen den Fibrillen findet sich hier direkt und regelmäßig der Fibrillenoberfläche aufsitzendes GAG-Material.

Die Interzellulärsubstanz des Knorpels bildet eine Ausnahme: Die kollagenen Fibrillen verlaufen isoliert ohne eine bestimmte Ordnung, und die GAG haben entweder einen breitbasigen direkten Kontakt zu den Fibrillen, aber ohne deutliche Ordnung, oder sie kommen unabhängig von den Fibrillen vor und lassen nur selten die beschriebenen feinen Fäden erkennen.

Innerhalb der Basalmembran sind mit der Rutheniumrot-Methode keine Strukturen nachweisbar, die sich besonders hervorheben.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird dann besonders auf die Erklärung und Deutung von drei Vorgängen eingegangen, an denen sich die GAG ursächlich beteiligen: die geordnete Aggregation der Kollagenvorstufen zu Fibrillen, die Regelung der Fibrillen- und Faserdicke und die Ausbildung der Textur.

Abb. 1

Rattenembryo Tag 12.

Mesenchymale Interzellularsubstanz aus der lat. Bauchwand mit GAG-Makromolekülen (O), von denen feine Fäden ausgehen (—→); kollagene Fibrillen (X) mit einem feinfila-mentären Netzwerk.

Vergrößerung 1 : 122 000

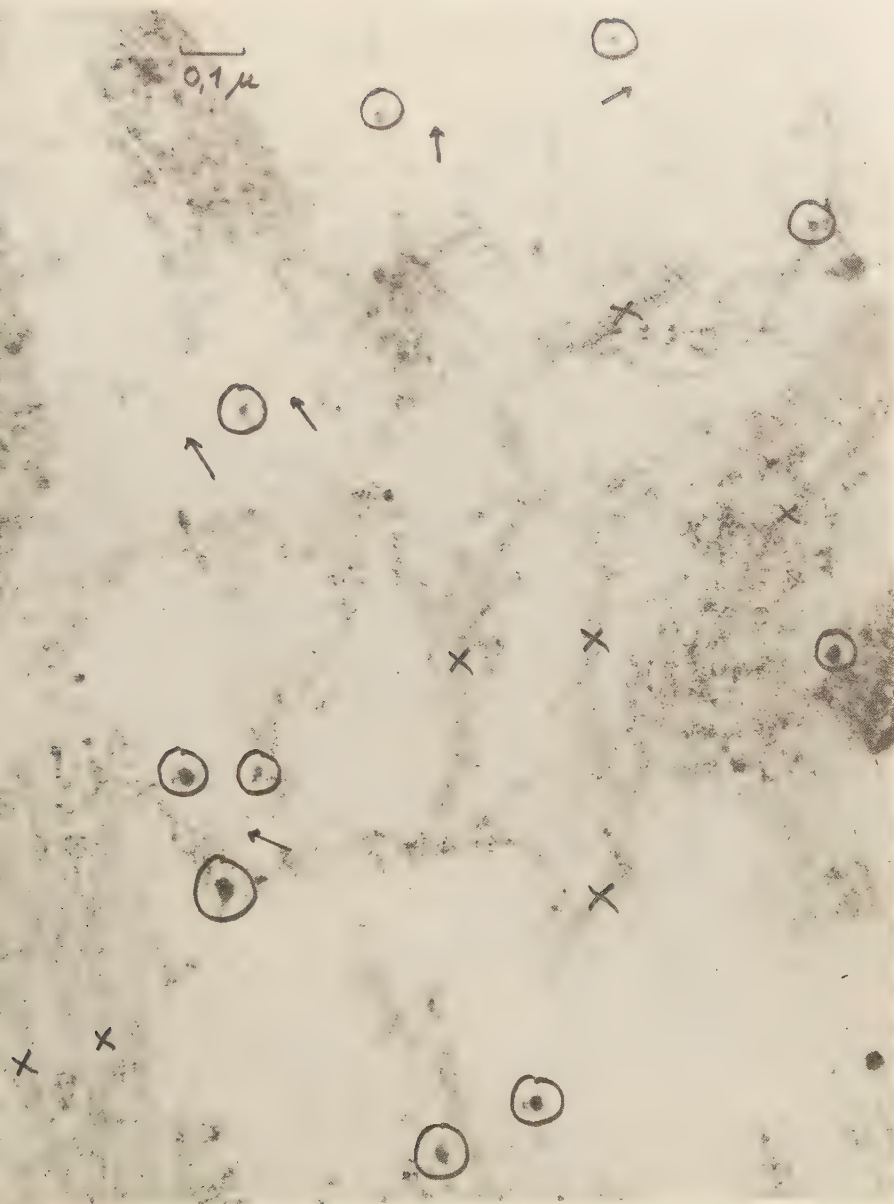


Abb. 2

Rattenembryo Tag 8.

GAG-Makromoleküle vom Typ 1 und vom Typ 2 aus dem praemesodermalen Mesenchym. Vom Typ 1 gehen zahlreiche feine Fäden aus.

Vergrößerung 1 : 122 000

$\overline{0.1\mu}$

2

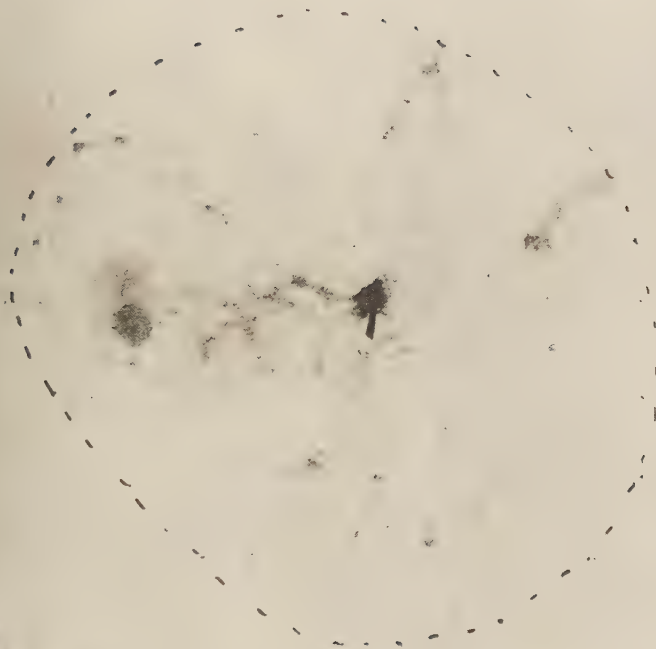


Abb. 3

Rattenembryo-Extremitätenknospe Tag 12.

Mesenchymaler Interzellularraum mit kollagenen
Fibrillen (X), Filamenten (—→) und GAG vom
2. Typ (O).

Vergrößerung 1 : 90 000

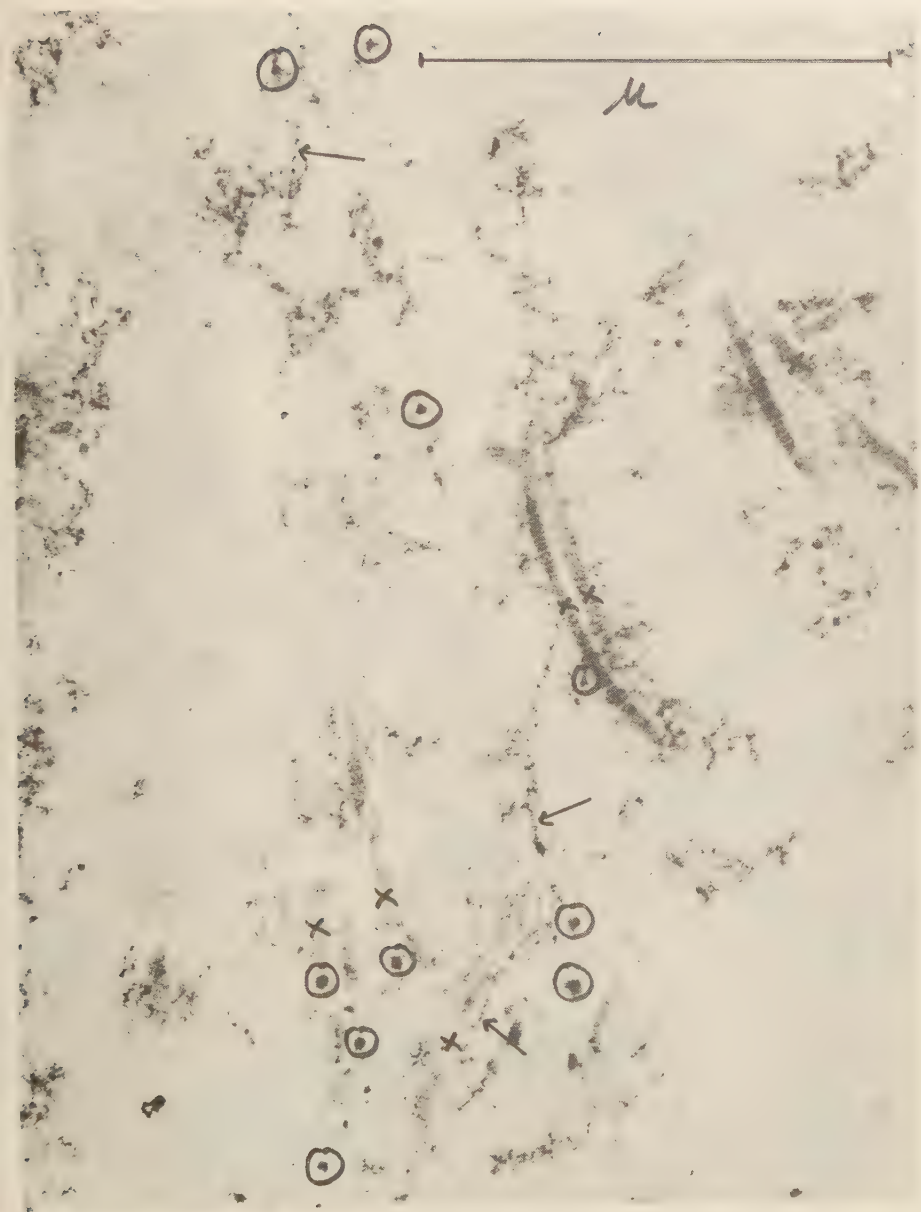


Abb. 4

Rattenembryo-Extremitätenknospe Tag 12.

Mesenchymaler Interzellulärraum mit kollagenen Fibrillen (X), Filamenten (—→) und GAG vom 2. Typ (O). Kollagene Fibrillen in ein Filamentnetzwerk eingebettet.

Vergrößerung 1 : 125 000

0,1 μ

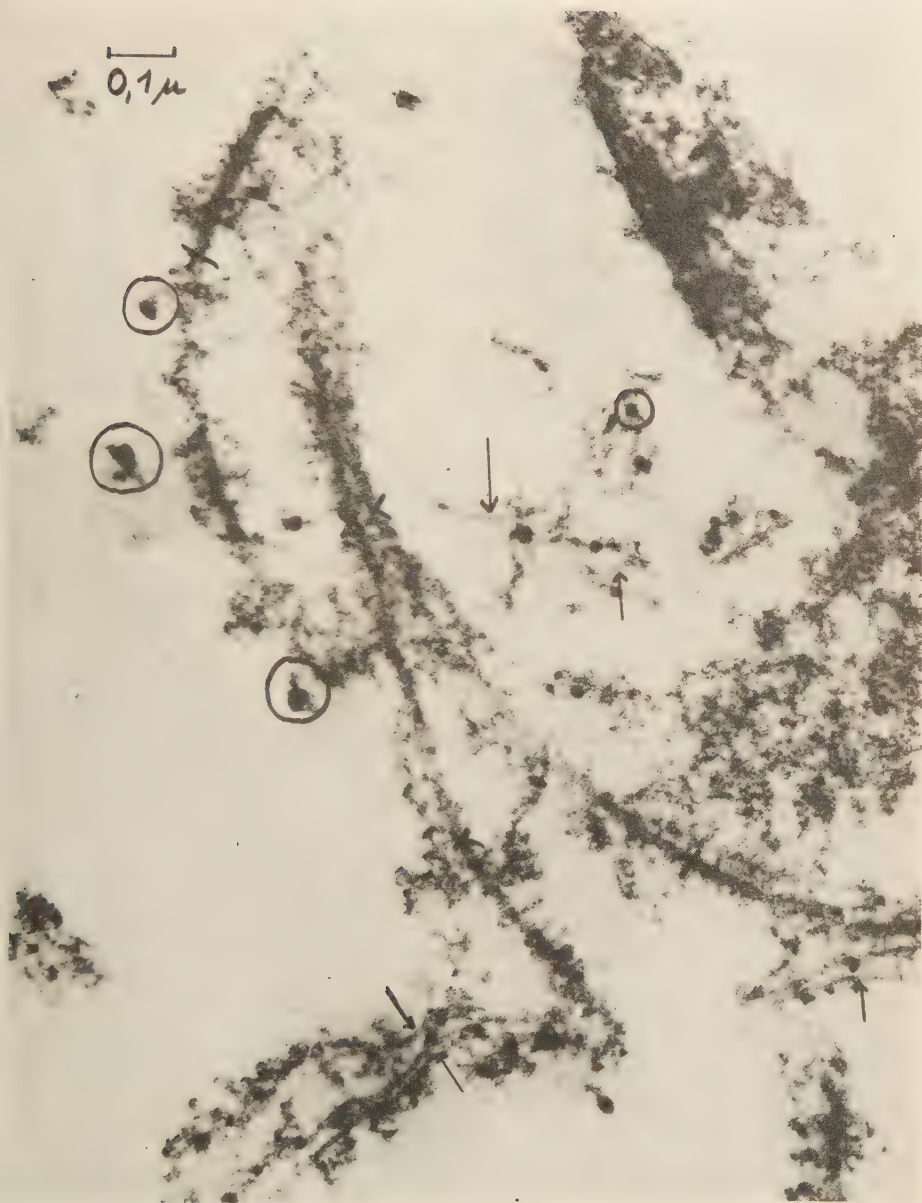


Abb. 5

Rattenembryo Tag 15.

Vorknorpelanlage. Im Interzellulärraum kollagene Filamente (—→) und aufsitzende oder isolierte GAG-Makromoleküle (O). ER = rauhes endoplasmatisches Retikulum der Knorpelzelle, N = Nucleus, ZM = Zellmembran.

Vergrößerung 1 : 102 000

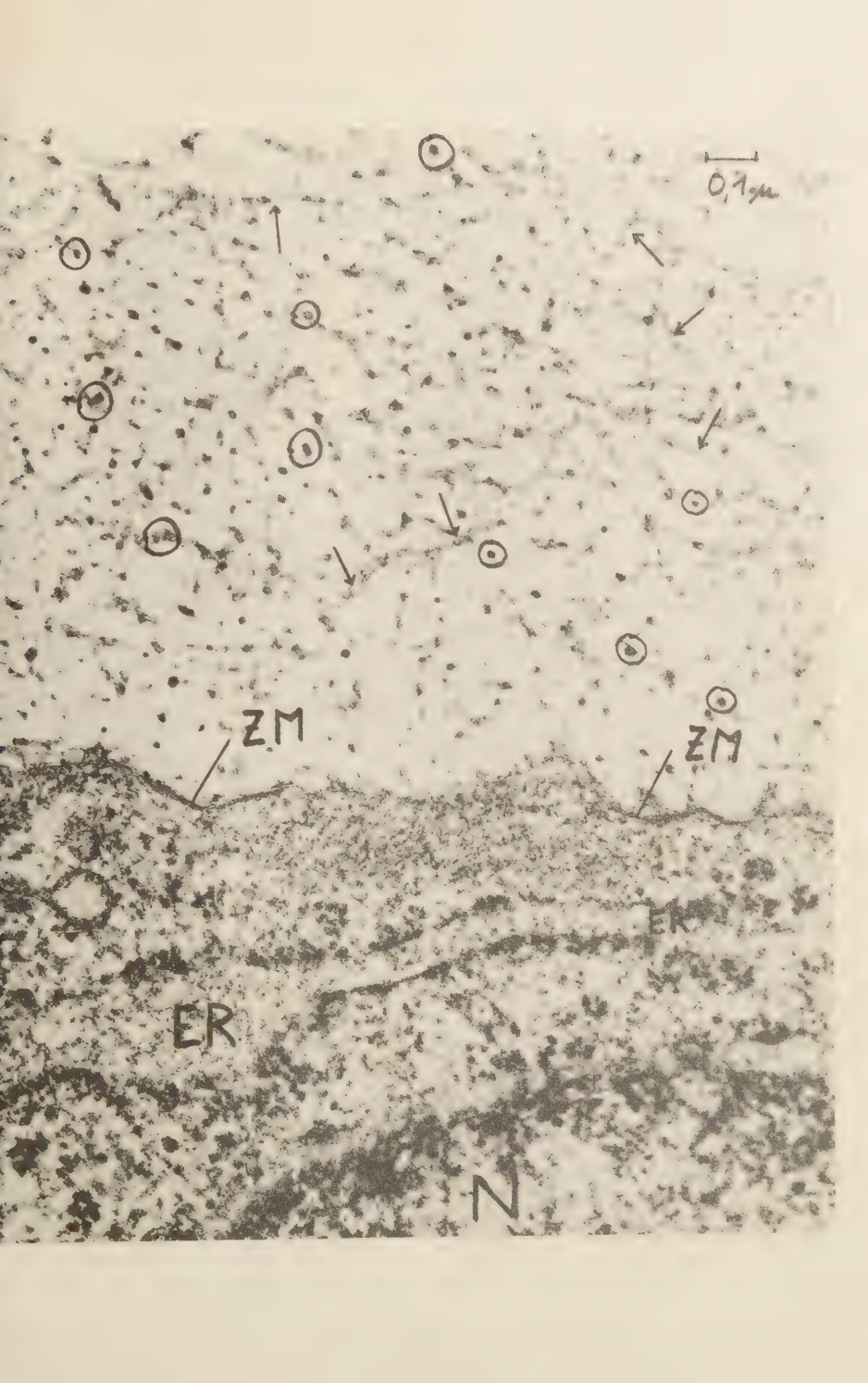


Abb. 6

Rattenembryo Tag 15.

Interzellulärraum aus dem Vorknorpel der oberen Extremität. Kollagene Filamente ($\longleftrightarrow$) und GAG-Makromoleküle (O).

Vergrößerung 1 : 120 000

0,1 μ

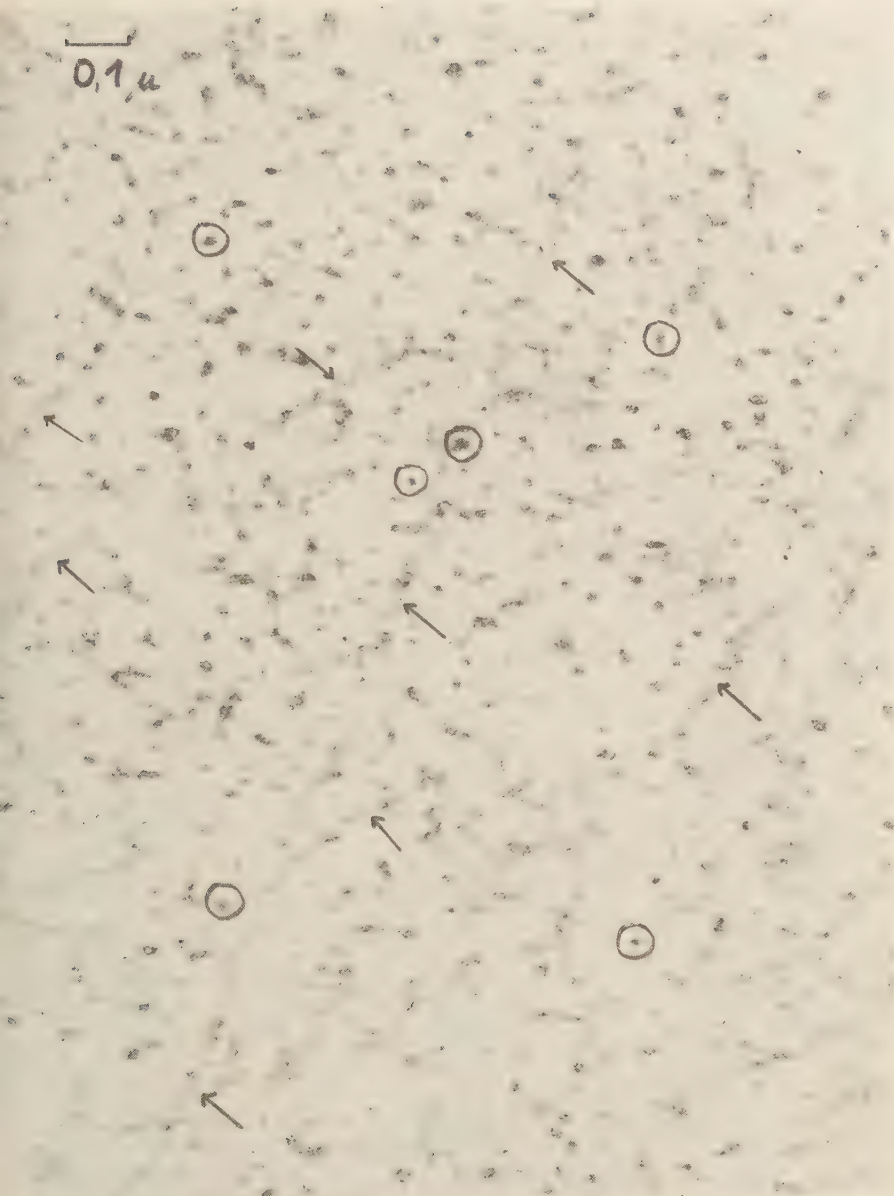


Abb. 7

Rattenembryo Tag 18.

Coriumgebiet. An den kollagenen Fibrillen teilweise angedeutet regelmäßig angeordnete GAG ($\longrightarrow$). GAG auch an Filamenten ($\longleftrightarrow$) und vorwiegend in der Peripherie der Fasern (F).

Vergrößerung 1 : 30 000

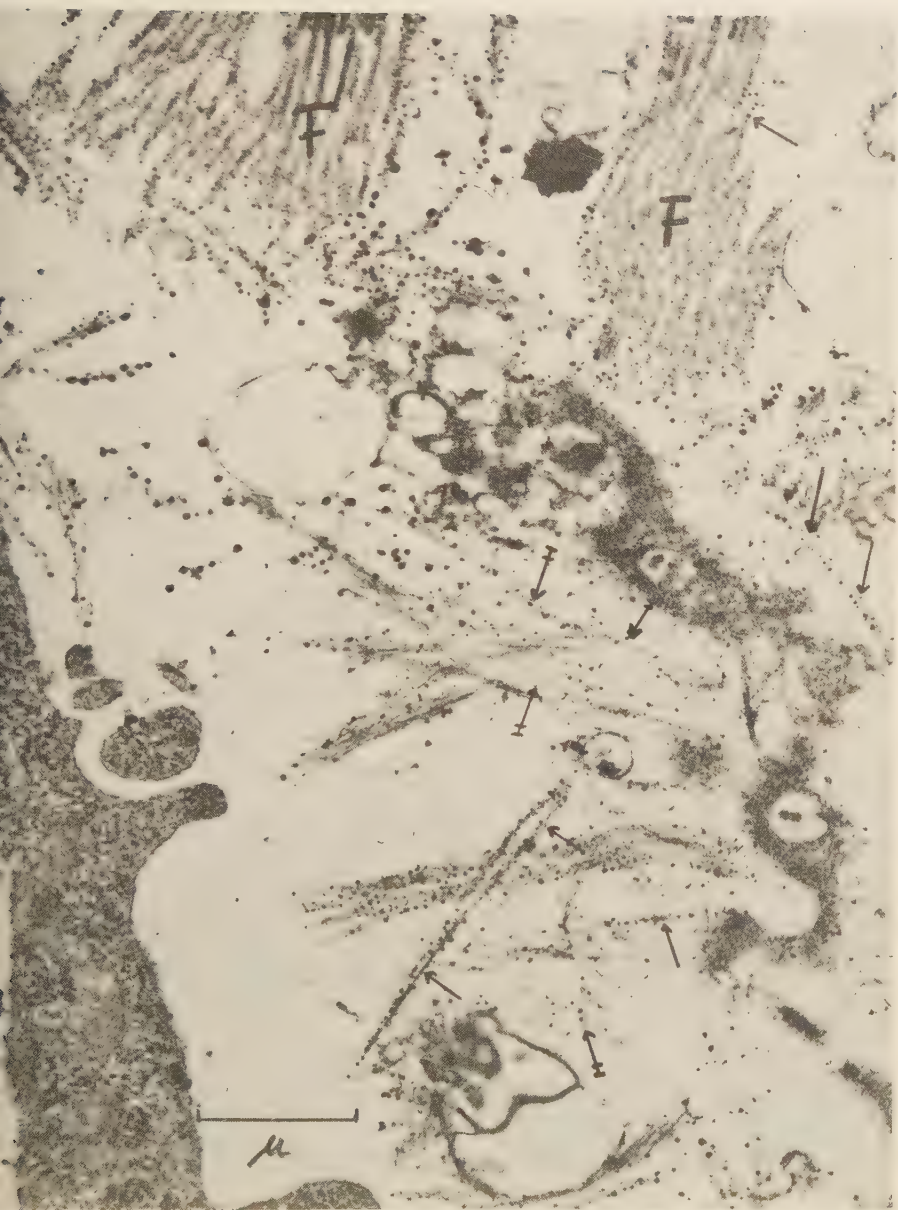


Abb. 8

Rattenembryo Tag 18.

Coriumbereich. Isoliert oder angedeutet gebündelt verlaufende Fibrillen mit aufsitzenden GAG (→) und GAG im Interzellularraum (O).

Vergrößerung 1 : 74 000



Abb. 9

Rattenembryo Tag 20.

Fibrillenbündel aus der Achillessehne mit typischen GAG (O) besonders in der Peripherie des Bündels. An den Fibrillen regelmäßig angeordnete Querstrukturen (→).

Vergrößerung 1 : 70 000

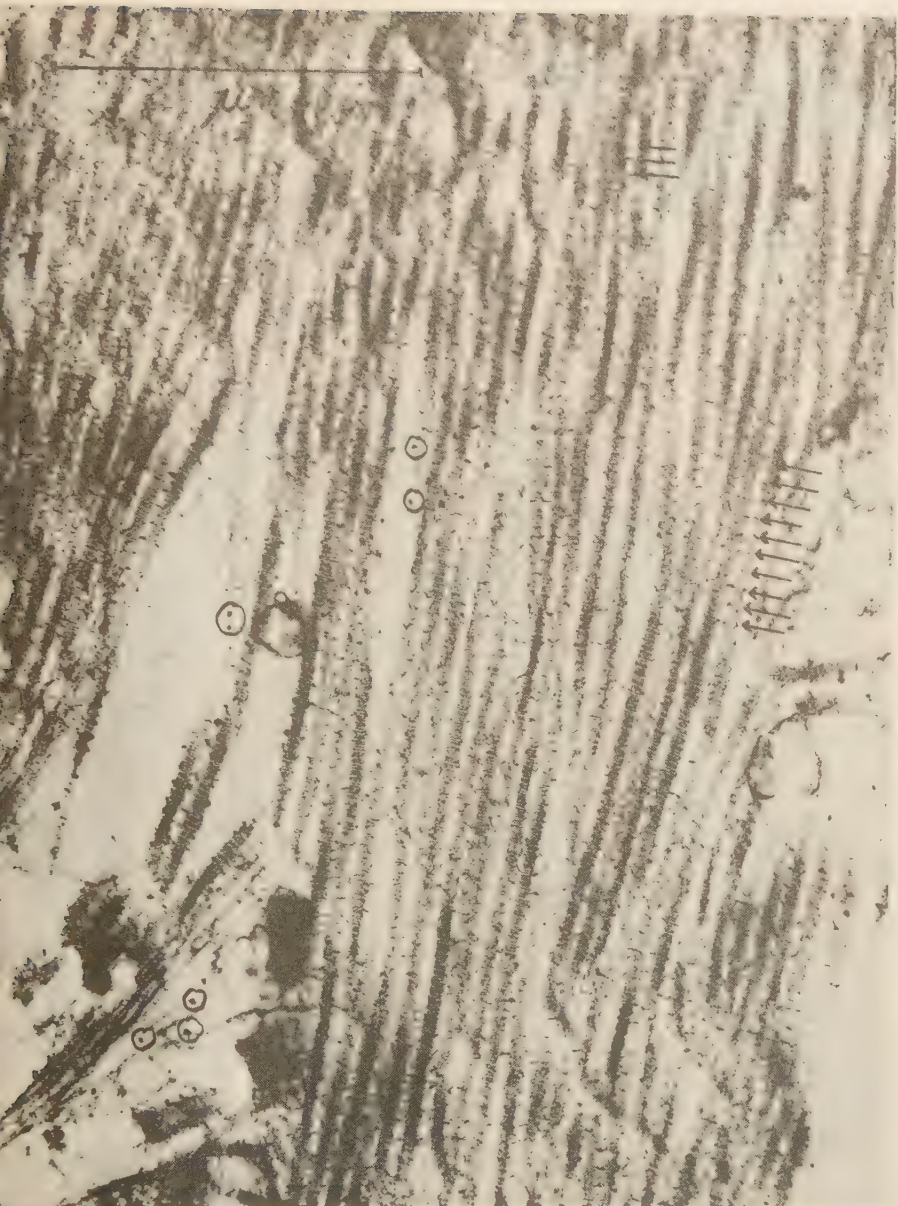
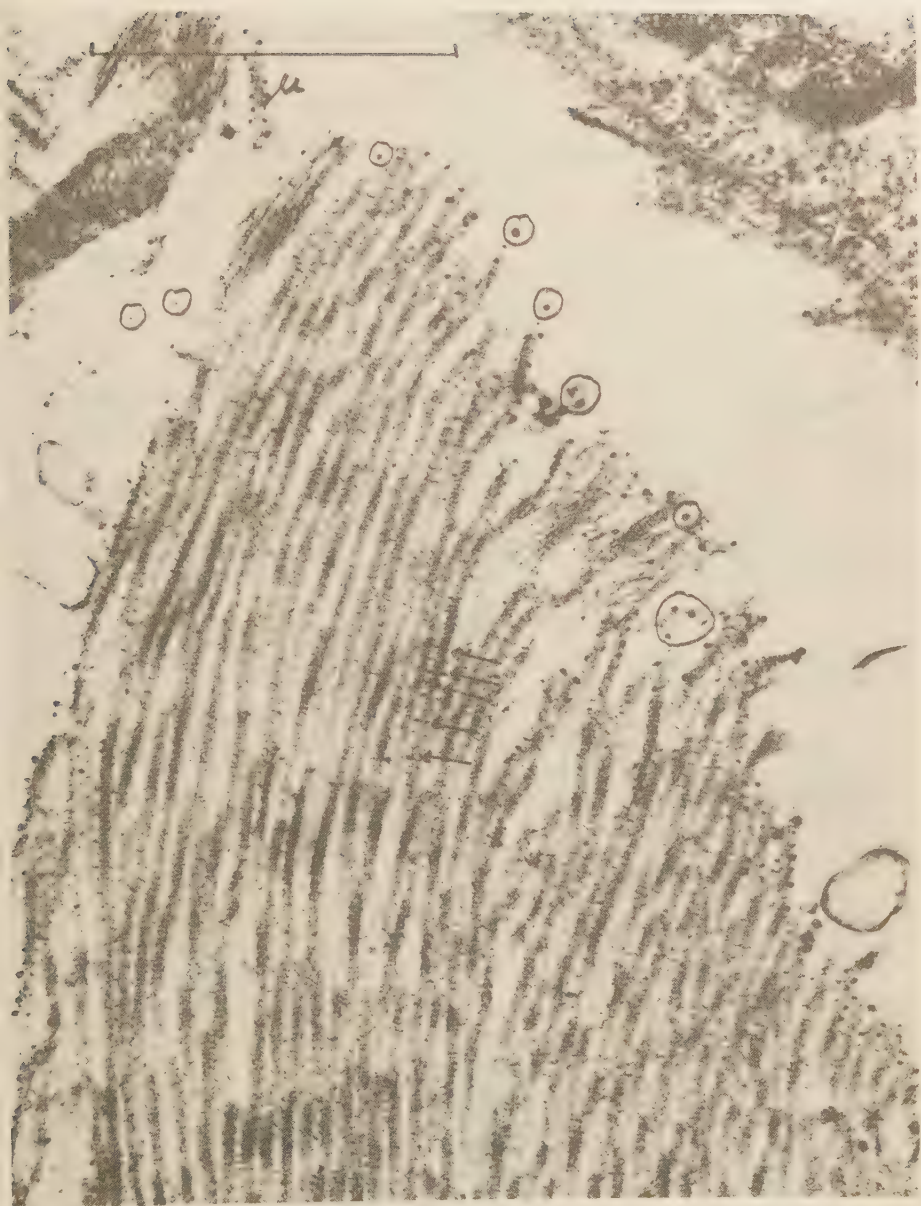


Abb. 10

Rattenembryo Tag 20.

Fibrillenbündel aus der Achillessehne mit typischen GAG (O) besonders in der Peripherie des Bündels. An den Fibrillen regelmäßig angeordnete Querstrukturen (→).

Vergrößerung 1 : 70 000



LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson, H.C., Sajdera, S.W.: The fine structure of bovine nasal cartilage.
J. Cell Biol. 49, 650-663 (1971).
- Badinez, O., Gasic, G., Loebel, F., Baydack, T.: Examination of golgi-zone using Halé's procedure.
Nature (London) 193, 704-705 (1962).
- Banga, J.: The structure of protein-polysaccharides and their role in the function of connective tissue fibres.
Acta Physiol. 35, 355 (1969).
- Blunk, M.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Epithel der Gaumenfortsätze von Rattenembryonen.
Inaugural-Dissertation an der F.U. Berlin (1970).
- Boedtke, H., Doty, P.: On the nature of the structural elements of collagen.
J. Amer. Chem. Soc. 77, 248-250 (1955).
- Bosman, H.B., Jackson, J.J.: Glycoprotein structure: The carbohydrate of corneal collagen.
Biochem. Biophys. Acta 170, 6-14 (1968).
- Brandt, K.D., Muir, H.: Heterogeneity of protein-polysaccharides of porcine articular cartilage. The chondroitin-sulphate proteins associated with collagen.
Biochemical J. 123, 747 (1971).
- Branwood, A.W.: The fibroblast. In: Internal Rev. of connective tissue res. (ed. by D.A. Hall), vol. 1, 1-28. Academic Press, London-New York (1963).
- Carsten, P.M., Merker, H.J., Günther, Th.: Über den Einfluß von Nebennierenrindenhormonen auf Fibrillen und Kittsubstanzen der Haut.
Z. f. Naturforsch. 166, 678 (1961).

- Dietrich, C.P., Montes de Oca, H.: Production of heparin related mucopolysaccharides by mammalian cells in culture.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 134, 955-962 (1970).
- Dziewiatkowski, D.P.: Intercellular synthesis of chondroitin sulfate.
J. Cell Biol. 13, 359-364 (1962).
- Eisenstein, R., Arsenis, C., Kuettner, K.E.: Elektron microscopic studies of cartilage matrix using lysozyme as a vital stain.
J. Cell Biol. 46, 626 (1970).
- Fell, P.E., Grobstein, C.: The influence of extraepithelial factors on the growth of embryonic mouse pancreatic epithelium.
Exp. Cell Res. 53, 301 (1968).
- Fernandez-Madrid, F.: Collagen Biosynthesis: A Review. Clinical Orthopaedics And Related Research 68, 163 (1970).
- Fernando, N.V.P., Movat, H.Z.: Fibrillogenesis in regenerating tendon.
Lab. Invest. 12, 214-229 (1963).
- Fewer, D., Threadgold, J., Sheldon, H.: Studies on cartilage V. Electronmicroscopic observations on the autoradiographic localization of ³⁵S in cells and matrix.
J. Ultrastruct. Res. 11, 166-172 (1964).
- Geyer, G., Linss, W., Schaaf, P.: Electron microscopic demonstration of a particulate component in the glycocalyx.
Experientia 26, 770 (1970).
- Godman, G.C., Lane, N.: On the site sulfation in the chondrocyte.
J. Cell Biol. 21, 353-366 (1964).

- Goldstein, M.A.: Anionic binding of ruthenium red in fish extraocular muscle.
Z. f. Zellforsch. u. Mikroskop. Anat. 102, 459 (1969).
- Grassmann, W., Engel, J., Hannig, K., Hörmann H., Kühn, K., Nordwig, A.: Kollagen. In: Fortschritte der Chemie organ. Naturstoffe 23, 195-314 (1965), ed. by L. Zechmeister, Springer-Verlag, Wien-New York.
- Grobstein, C.: Epitheliomesenchymal specificity in the morphogenesis of mouse submandibular rudiments in vitro.
J. exp. Zool. 124, 383-414 (1953).
- Gross, J.: The behavior of collagen units as a model in morphogenesis.
J. biophys. biochem. Cytol. 2 (Suppl.), 261-274 (1956).
- Günther, Th., Carsten, P.M.: Über die Löslichkeit von Kollagen in Abhängigkeit von Nebennierenrindenhormonen.
Naturwissenschaften 48, 699 (1961).
- Hackelberg, H.H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung und Reifung des Corneastromas bei der Ratte.
Inaugural-Dissertation an der F.U. Berlin (1971).
- Hodge, A.J.: Principles of ordering in fibrous system. In: 4. Internat. Kongr. Elektr. Mikrosk. Berlin, 1958. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, Vol. 2, 119-139 (1960).
- Hörmann, H., Wilm, M.v.: Kollagensegmente mit symmetrischer Querstreifung.
Naturwissenschaften 51, 464-465 (1964).

- Horwitz, A.L., Dorfman, A.: Subcellular sites for synthesis of chondromucoprotein of cartilage.
J. Cell Biol. 38, 358-368 (1968).
- Kajikawa, K., Nakanishi, J., Hori, J., Matsuda, Y., Kondo, K.: Electron microscopic observations on connective tissues using ruthenium red staining.
J. of Electron Microscopy 19, 1 (1970).
- Katzman, R.L., Jeanloz, R.W.: Are acidic polysaccharides involved in collagen fibril formation or stabilization?
Biochemica et Biophysica Acta 229, 516 (1971).
- Klöppel, I.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Beginn der Basalmembran- und Fibrillenbildung im Interzellularraum früher Hühnerembryonen.
Inaugural-Dissertation an der F.U. Berlin (1969).
- Kühn, K.: The influence of mucoproteins on the formation and stabilization of collagen fibrils.
Leder (Abstr.) 13, 156 (1962).
- Kühn, K., Grassmann, W., Hofman, U.: Über den Aufbau der Kollagenfibrille aus Tropokollagenmolekülen.
Naturwissenschaften 47, 258-259 (1960).
- Kühn, K., Zimmer, E.: Die Eigenschaften des Tropokollagenmoleküls und ihre Bedeutung bei der Fibrillenbildung.
Z. f. Naturforsch. 166, 648-658 (1961).
- Leimeister, M.L.: Das elektronenmikroskopische Bild der Nerven und Gefäße in den Gaumenfortsätzen und im definitiven Gaumen bei Rattenembryonen.
Inaugural-Dissertation an der F.U. Berlin (1970).

- Lindner, J.: Über die Synthese der organischen Interzellulärsubstanz im Knorpel und Knochen.
Verh. dtsch. Ges. Path. 47, 150-157 (1963).
- Louisot, P., Got, R.: Subcellular sites of glycoprotein biosynthesis.
Bull. Soc. Chem. Biol. (Paris) 52, 455-548 (1970).
- Lowther, D.A., Toole, B.P., Herrington, A.C.: Interaction of proteoglycans with tropocollagen.
In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix (ed. by E.A. Balazs), vol. 2, 1135-1153 (1970). Academic Press, London-New York.
- Luft, J.H.: The fine structure of hyaline cartilage matrix following ruthenium red fixative and staining.
J. Cell Biol. 27, 61 (1965).
- Mathews, M.B.: The interaction of proteoglycans and collagen-model systems.
In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix (ed. by E.A. Balazs), vol. 2, 1155 (1970). Academic Press, London-New York.
- Matukas, V.J., Panner, B.J., Orbison, J.L.: Studies on the ultrastructural identification and distribution of protein polysaccharide in cartilage matrix.
J. Cell Biol. 32, 356-377 (1967).
- Merker, H.J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese im menschlichen Granulationsgewebe.
Langenbecks Arch. Chir. 297, 411-423 (1961 a).
- Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen.
Z. Zellforsch. 53, 411-430 (1961 b).

- Merker, H.J.: Beobachtungen an den DNS-Fäden der Mitochondrien.
Verh. Anat. Ges. 125, 229 (1969).
- The formation of connective tissue.
1. Symposium des Sonderforschungsbe-
reiches 29, im Druck (1971).
- Persönliche Mitteilung (1972).
- Greiling, H., Günther, Th.: Bildung von Hyaluronsäure in Aszites-
Tumorzellen.
Z. Krebsforsch. 63, 490-496 (1960).
- Stuwe, K.: Elektronenmikroskopische Untersuchung
zum Problem der Sekretion der binde-
gewebigen Interzellulärsubstanz.
Z. Zellforsch. 115, 212-225 (1971).
- Neubert, D.: The formation of mesenchyme and the
influence of drugs.
Advances in teratology, in prepara-
tion (1972).
- Meyer, F.A., Comper, W.D., Preston, B.N.: Model connective tissue
systems.
A physical study of gelatin gels con-
taining proteoglycans.
Biopolymers 10, 1351 (1971).
- Meyer, K.: The chemistry of the ground substance
in connective tissue.
In: Connective tissue in health and
disease (ed. by G. Asboe-Hansen) 54-69
(1954), Munksgaarden, Copenhagen.
- Biochemistry and biology of mucopoly-
saccharides.
The Amer. J. of Med. 47, 664 (1969).
- Myers, D.B., Highton, T.C., Rayans, D.G.: Acid mucopolysaccharides
closely associated with collagen fi-
brils in normal human synovium.
J. Ultrastruct. Res. 28, 203-213 (1969).

- Nemetschek, Th.: Zur Frage typischer Querstreifungsmuster des Kollagens. Naturwissenschaften 32, 478 (1965).
- Neuner, B.: Das elektronenmikroskopische Bild des Mesenchyms der Gaumenfalten bei Rattenembryonen. Inaugural-Dissertation an der F. U. Berlin (1970).
- Öbrink, B.: Studies on the electrostatic interaction between collagen and chondroitin-4-sulfat. In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix (ed. by E. A. Balazs), vol. 2, 1171 (1970), Academic Press, London-New York.
- Wasteson, A.: Nature of the interaction of chondroitin-4-sulphate and chondroitin sulphate-proteoglycan with collagen. Biochem. J. 121, 227 (1971).
- Pihl, E.: A quantitative elektron histochemical estimation of ruthenium red binding to heparin in mast cell granules. Histochemie 22, 302 (1970).
- Gustavson, G.T., Falkmer, S.: Ultrastructural demonstration of cartilage acid glycosaminoglycans. Histochem. J. 1, 26-35 (1968).
- Priestly, G.C., Pruyn, M.L., Malt, R.A.: Glycoprotein synthesis by membrane bound ribosomes and smooth membranes in kidney. Biochem. biophys. Acta (Amst.) 190, 154-160 (1969).
- Prockop, D.J.: The intracellular biosynthesis of collagen. Arch. Intern. Med. 124, 563-592 (1969).
- Revel, J.P.: J. Microscopie 3, 535 (1964).

- Rohr, H.: Die Kollagensynthese in ihrer Beziehung zur submikroskopischen Struktur der Osteoblasten.
Virchows Arch. path. Anat. 338, 342-354 (1965).
- Rohr, H.P., Jurukova, Z.: Beitrag zur Bildung bindegewebiger Matrix in glatten Muskelzellen. Elektronenmikroskopisch-autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -Prolin und ^{35}S -Sulfat am Oestrogen-stimulierten Mäuseuterus.
Path. europ. 3, 571-578 (1968).
- Ross, R.: The fibroblast and wound repair.
Biol. Rev. 43, 51-72 (1968).
- Benditt, E.P.: Wound healing and collagen formation. V quantitative EM radioautographic observations of Prolin- ^3H utilization by fibroblasts.
J. Cell Biol. 27, 83-106 (1965).
- Roy, S.: Ultrastructure of articular cartilage in experimental immobilization.
Annals of The Rheumatic Diseases 29, 634 (1970).
- Schmitt, F.O.: The macromolecular basis of collagen structure.
In: Connective tissue, thrombosis and atherosclerosis (ed. by Page), Acad. Press, New York-London, 43-66 (1959).
- Schwarz, W.: Über die Morphologie der verschiedenen Bindegewebsfasern unter besonderer Berücksichtigung des Kollagens.
Beitr. Silikoseforsch. 1, 173-184 (1955).
Morphology and differentiation of connective tissue fibres.
In: Connective tissue, Cioms, Blackwell Sci. Publ., Oxford, 144-156 (1957).

Schwarz, W.:

Heutige Vorstellungen über die ultra-
mikroskopische Struktur des Bindegewe-
bes.

In: Struktur und Stoffwechsel des Bin-
degewebes (Hrsg. Hauss und Losse), G.
Thieme-Verl., Stuttgart, 106-130 (1960).

--
Fibrillogenese und Bildung der elastischen Fasern.

Arch. Biol. 75, 369-396 (1964).

-- Merker, H.J., Jahnke, A., Hofmann, M.: Wachstum und Altern des Bindegewebes.

Berliner Medizin, Sonderheft 10 Jahre
F. U., 88-90 (1958).

-- Merker, H.J.:

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Innenversilberung der Sehnenfibrille.

Z. Histochemie 1, 225-240 (1959).

Serafini-Fracassini, A., Smith, J.W.: Proc. Roy. Soc. 165, 440 (1966).

-- Durward, J.J., Floreani, L.: Characterization of the heparin-protein complex of ox-liver capsule and its molecular organization in the mast-cell granule.

In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix (ed. by E.A. Balazs), vol. 2, 981-989 (1970). Academic Press, London-New York.

-- Stimson, W.H.:

Studies on the molecular organization of the proteoglycan of bovine nasal cartilage.

In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix (ed. by E.A. Balazs), vol. 2, 887-894 (1970). Academic Press, London-New York.

- Serafini-Fracassini, A., Wells, P.J., Smith, J.W.: Studies on the interaction between glycosaminoglycans and fibrillar collagen.
In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix (ed. by E. A. Balazs), vol. 2, 1201-1215 (1970).
Academic Press, London-New York.
- Smith, J.W., Frame, J.: J. Cell Sci. 4, 421 (1969).
- Serafini-Fracassini, A.: J. Cell Sci. 3, 33 (1968).
- Toole, J.: Insoluble fibrils formed in the presence of sulphated acid mucopolysaccharide protein.
Nature 222, 872 (1969).
- Wassermann, F.: The intercellular components of connective tissue: origin, structure and interrelationship of fibres and ground substance.
Ergeb. Anat. Entw.-Gesch. 35, 240-333 (1956).
- Wasteson, A., Öbrink, B.: Demonstration of an interaction between collagen and chondroitinsulphate.
Biochem. Biophys. Acta 170, 201-203 (1968).
- Weiss, P.: Rev. of Modern Physics 31, 11 (1959).
- Wessels, N.K.: Effects of extraepithelial factors on the incorporation of thymidine by embryonic epidermis.
Exp. Cell Res. 30, 36-55 (1963).
- Wood, G.C.: The formation of fibrils from collagen solutions. 2. A mechanism of collagen fibril formation.
Biochem. J. 75, 598 (1960).

Lebenslauf

Am 25. 3. 1944 wurde ich als Sohn des Dipl. Ing. Fritz Utesch und seiner Ehefrau Johanna Utesch, geb. Bartelt, in Cammin in Pommern geboren.

In Darmstadt besuchte ich die Grundschule und das Gymnasium (Georg-Büchner-Schule), an dem ich am 5. 3. 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im November 1963 begann ich mein Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, der ich ununterbrochen bis zum Staatsexamen angehört habe.

Die naturwissenschaftliche (5. 10. 1964) und die ärztliche (17.2.1967) Vorprüfung sowie die ärztliche Prüfung (25.8.1970) legte ich an der Freien Universität jeweils mit der Note "sehr gut" ab.

Meine Medizinalassistentenzeit habe ich im Städt. Behring-Krankenhaus (1.11.1970-31.12.1971) verbracht und habe am 10.1.1972 meine Approbation als Arzt erhalten.

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31

